

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200426014

UDC_____

厦门大学

博士学位论文

对虾养殖环境微生物多样性分析
和微生态制剂的研究与应用

Molecular analysis of Microbial Diversity in Shrimp
Culture Environment and Study and Application of
Probiotics for Shrimp Aquaculture

李 可

指导教师姓名: 郑天凌 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2007 年 7 月 23 日

论文答辩日期: 2007 年 8 月 17 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 肖湘 教授

评 阅 人: _____

2007 年 8 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的工作成果。对本文的研究工作作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日 期： 年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ☒ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘 要.....	i
Abstract.....	iii
第一章 前言.....	1
1.1 对虾养殖业现状	2
1.2 养殖系统脆弱性的根源	3
1.2.1 养殖池生态结构的特殊性.....	3
1.2.2 养殖生态环境的污染.....	5
1.2.3 养殖生态环境污染的结果.....	7
1.3 养殖生态系统的微生态调控	8
1.3.1 微生物在养殖生态系统中的地位和作用.....	8
1.3.2 养殖生态环境微生物多样性研究的意义及现状.....	9
1.3.3 养殖环境的微生态调控措施.....	10
1.4 微生态制剂在水产养殖中的应用及作用原理	10
1.4.1 水产微生态制剂的定义.....	10
1.4.2 微生态制剂在水产养殖中的应用.....	11
1.4.3 微生态制剂的作用机理.....	15
1.5 微生态制剂候选菌株存在的缺陷与展望	17
1.6 本研究工作的意义及研究思路	19
第二章 对虾养殖环境微生物多样性分析	21
2.1 引言	21
2.2 材料与方法	22
2.3 结果与分析	31
2.3.1 对虾养殖环境样品 16SrDNA 文库的构建	31
2.3.2 对虾养殖环境微生物多样性分析.....	34
2.4 讨论	46
第三章 对虾养殖环境中产芽孢细菌的分离与鉴定	50

3.1 引言	50
3.2 材料与方法	51
3.3 结果与分析	58
3.3.1 细菌平板计数结果.....	58
3.3.2 菌株鉴定结果.....	59
3.4. 讨论	60
第四章 对虾养殖环境中产芽孢细菌的消化酶活性分析	64
4.1 引言	64
4.2 材料与方法	65
4.3 结果与分析	71
4.3.1 产淀粉酶菌株的初筛.....	71
4.3.2 产脂肪酶菌株的初筛.....	71
4.3.3 产蛋白酶菌株的初筛.....	71
4.3.4 不同发酵条件对菌株产淀粉酶的影响.....	72
4.3.5 不同发酵条件对菌株产蛋白酶的影响.....	78
4.3.6 不同发酵条件对菌株产生脂肪酶活的影响.....	84
4.4 讨论	90
第五章 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道菌群和免疫机能的影响....	95
5.1 引言	95
5.2 材料与方法	95
5.3 结果与分析	98
5.3.1 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾肠道细菌数量的影响.....	98
5.3.2 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾血细胞数的影响.....	99
5.3.3 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾血淋巴上清总蛋白的影响.....	99
5.3.4 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾血淋巴上清 PO 活性的影响	100
5.3.5 地衣芽孢杆菌对凡纳滨对虾血淋巴上清 SOD 活性的影响.....	101
5.4 讨论	101
第六章 地衣芽孢杆菌的微胶囊化实验研究	106

6.1 引言	106
6.2 材料与方法	107
6.3 结果与分析	108
6.3.1 保护剂对吸附效果的影响.....	108
6.3.2 pH 对吸附效果的影响.....	109
6.3.3 温度对吸附效果的影响.....	110
6.3.4 时间对吸附效果的影响.....	110
6.4. 讨论	111
第七章 结论与展望	113
7.1 结论	113
7.2 本论文创新点	113
7.3 展望	114
参考文献.....	115
附 录.....	133
附录一 参与的课题、发表和待发表的文章	133
附录二 载体图谱	134
附录三 DNA 分子量标准.....	135
附录四 S-40 菌株 Vitek 系统鉴定结果.....	136
附录五 S-40 菌株 16S rDNA 基因测序结果	137
附录六 缩略语对照表	138
致 谢.....	139

Catalogue

Chinese abstract.....	i
English abstract.....	iii
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Developing status of shrimp farming.....	2
1.2 Cause of the variability of aquaculture ecological system	3
1.2.1 Particularities of aquaculture environment	3
1.2.2 Contamination in aquaculture environment.....	5
1.2.3 Consequence of pollution in aquaculture environment	7
1.3 Microecological control methods of aquaculture ecosystem.....	8
1.3.1 Role of microorganisms in aquacultural environment.....	8
1.3.2 Significance and status of research on microbial diversity in aquicultural environment	9
1.3.3 Microecological control measures in culturing ponds	10
1.4 Application and mechanism of probiotics for aquaculture.....	10
1.4.1 Definition of aquaculture probiotics	10
1.4.2 Application of probiotics to aquaculture.....	11
1.4.3 Mechanism of probiotics used in aquaculture	15
1.5 Shortcoming and perspective of probiotics	17
1.6 Significance of this study	19
Chapter 2 Molecular analysis of Microbial Diversity in Shrimp Culture Environment.....	21
2.1 Preface.....	21
2.2 Material and methods.....	22
2.3 Results and analysis	31
2.3.1 Construction of 16S rDNA library	31
2.3.2 RFLP analysis of 16S rDNA library	34

2.4 Discussion.....	46
Chapter 3 Isolation and identification of spore-forming bacteria isolated from shrimp pond	50
3.1 Perface.....	50
3.2 Material and methods.....	51
3.3 Results and analysis	58
3.3.1 The count of spore-forming bacteria from shrimp pond.....	58
3.3.2 Identification of spore-forming bacterial isolate.....	59
3.4. Discussion.....	60
Chapter 4 Analysis of digestive enzyme activity from spore-forming bacteria.....	64
4.1 Perface.....	64
4.2 Material and methods.....	65
4.3 Results and analysis	71
4.3.1 Screening of amylase-producing strain.....	71
4.3.2 Screening of protease-producing strain	71
4.3.3 Screening of lipase-producing strain	71
4.3.4 Study on fermentation conditions of amylase-producing stain.....	72
4.3.5 Study on fermentation conditions of protease-producing stain	78
4.3.6 Study on fermentation conditions of lipase-producing stain	84
4.4 Discussion.....	90
Chapter 5 Effects of <i>Bacillus licheniformis</i> on the intestinal microflora and immunity of <i>L.vannamei</i>	95
5.1 Perface.....	95
5.2 Material and methods.....	95
5.3 Results and analysis	98
5.3.1 Effect of <i>B. licheniformis</i> on bacterial count in digestive tracts of <i>L. vannamei</i>	98

5.3.2 Effect of <i>B. licheniformis</i> on haemocyte counts in <i>L. vannamei</i>	99
5.3.3 Effect of <i>B. licheniformis</i> on protein concentration of <i>L. vannamei</i> ...	99
5.3.4 Effect of <i>B. licheniformis</i> on PO activity of <i>L. vannamei</i>	100
5.3.5 Effect of <i>B. licheniformis</i> on SOD activity of <i>L. vannamei</i>	101
5.4 Discussion.....	101
Chapter 6 Study on technology of embedding <i>B. licheniformis</i> in microporous starch	106
6.1 Perface.....	106
6.2 Material and methods.....	107
6.3 Results and analysis	108
6.3.1 Effect of protecant on absorption properties	108
6.3.2 Effect of pH on absorption absorption properties.....	109
6.3.3 Effect of temperature on absorption properties	110
6.3.4 Effect of time on absorption properties	110
6.4. Discussion.....	111
Chapter 7 Conclusions.....	113
7.1 Conclusions.....	113
7.2 Innovation of this paper	113
7.3 Prospect.....	114
References	115
Appendix	133
1 Fund and papers	133
2 Vector	134
3 DNA Markers	135
4 Vitek result.....	136
5 16S rDNA sequence result	137
6 Abbreviations.....	138
Acknowledgment.....	139

摘要

本论文针对水产养殖现行使用的微生物制剂作用时效短,在使用过程中优势地位不明显等缺陷,基于微生态理论和芽孢杆菌作为微生态制剂的优良特性,从对虾养殖环境获得一批产芽孢细菌,并加以鉴定;以胞外消化酶为指标分离筛选可高效降解水产养殖残余饵料淀粉、蛋白及脂肪作用的若干株产芽孢功能菌,通过酶活性测定,确定一株地衣芽孢杆菌 S-40 作为潜在益生菌进行了对虾养殖实验;研究了对虾养殖环境的细菌群落组成,主要研究结果如下:

1. 构建了对虾养殖环境细菌 16S rDNA 文库,研究其细菌群落组成。结果表明:对虾肠道细菌分属于变形细菌(Proteobacteria) 和厚壁菌类群(Firmicute), Proteobacteria 占据了绝对优势,为 98.7%, 其中 γ -Proteobacteria 为 97.4%; 养殖水体菌群主要由变形细菌(24.1%)和拟杆菌门(17.7%)组成, 其中 α -Proteobacteria 所占比例为 21.5%; 养殖环境表层沉积物的细菌多样性要丰富得多,有变形细菌(52.3 %), 拟杆菌门(Bacteroidetes, 9.3%), 浮霉状菌(Planctomycete, 4.7%), 厚壁菌类群(Firmicute, 1.9%)和放线菌门(Actinobacteria, 0.9%)。此外,水样和沉积物中蕴含着数量丰富的单细胞藻类,它们的比例分别高达 55.7%和 23.4%。
2. 从对虾养殖环境(对虾肠道和虾池表层沉积物)分离筛选出 191 株产芽孢细菌,细胞形态和 RFLP 分型后,对其中 70 株菌进行了生理生化以及分子生物学方法鉴定。结果显示它们分属于短芽孢杆菌属 (2 株)、芽孢乳杆菌属 (2 株)、类芽孢杆菌属 (4 株) 和芽孢杆菌属 (44 株)。其中芽孢杆菌属中,我们鉴定得到 13 个种,包括环状芽孢杆菌、迟缓芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、球形芽孢杆菌、花园芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、泛酸芽孢杆菌、短小芽孢杆菌,坚强芽孢杆菌、纺锤芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌。
3. 利用选择性培养基,从前期工作得到的产芽孢细菌中分别筛选出 9 株具有较高淀粉酶、蛋白酶和脂肪酶活性的菌株,对其发酵条件以及粗酶液性质进行了初步的研究。结果表明多株菌在一定的温度、pH 及盐度区间内均有较强的酶活力,一株地衣芽孢杆菌 S-40 由于其良好而稳定的消化酶活性,作为

养殖水体添加剂进行对虾养殖实验。

4. 应用从对虾养殖环境筛选的一株地衣芽孢杆菌 S-40, 作为潜在的微生态制剂菌株, 分别以 10^3 cfu/mL, 10^4 cfu/mL, 10^5 cfu/mL 三种不同浓度添加到凡纳滨对虾养殖水体中, 测定了饲养 40 天后对虾消化道的总菌和弧菌数及多项免疫指标。结果显示: 与对照组对虾相比, 所有实验组对虾消化道的弧菌数有显著下降, 而总菌数没有呈现显著性差异; 所有实验组中对虾血淋巴上清液的血细胞数, 酚氧化酶活性(PO)均有显著性上升, 超氧化物歧化酶(SOD)仅在 10^5 cfu/ml 时有显著上升, 菌剂的加入对对虾血淋巴上清液的蛋白浓度并无显著影响。
5. 本研究选用微孔淀粉为吸附剂吸附地衣芽孢杆菌 S-40 菌株芽孢, 通过多因素分析, 确定最佳的吸附包埋条件: pH 7.5, 温度 30 °C, 吸附时间 1.5 h。

关键词: 对虾, 水产养殖, 微生物多样性, 微生态制剂

Abstract

The probiotics recently used in aquaculture have the deficiency of short effect time and no obvious dominance in the environment. This study aimed at exploring the application potential of spore-producing bacteria to shrimp aquaculture based on the microecological theory and the good characteristics of *Bacillus* used as probiotics in the previous works. Many spore-producing bacteria were therefore isolated from shrimp aquaculture environment and shrimp intestinal. Their abilities to remove the feeding remains in the aquaculture were evaluated by determining the activity of producing extracellular digestive enzymes (amylase, protease and lipase). Then, a potential probiotic *Bacillus licheniformis* strain S-40 was tested as an additive for improving the shrimp aquaculture. In addition, the bacterial compositions of shrimp aquaculture systems were investigated in the study.

The main results were as follows:

1. The bacterial compositions in the shrimp culturing environment were characterized by analyzing three 16S rDNA clone libraries constructed from the intestines of shrimp, water and surface sediment of the shrimp pond respectively. The RFLP analysis and sequence alignment of 16SrDNA libraries showed that intestinal microflora in shrimp belonged to Proteobacteria(98.7%) and Firmicute(1.3%) phylogenetically, of which γ -Proteobacteria was dominant (97.4%) compared to α -Proteobacteria (1.3%); The bacteria in shrimp pond water mainly consisted of Proteobacteria(24.1%) and Bacteroidetes(17.7%), with α -Proteobacteria 21.5%;The bacterial diversity was much higher in the surface sediment of the shrimp pond with the proportion of 52.3% Proteobacteria, 9.3% Bacteroidetes, 4.7% Planctomycete, 1.9% Firmicute and 0.9% Actino- bacteria. However, it deserved to mention that in the water and sediment sample, approximately 55.7% and 23.4% of representative sequences were PCR-amplified from unicellular algae, probably derived from the organelle.
2. One hundred and ninety-one spore-producing bacteria were isolated from shrimp

intestines and the sediments of shrimp pond. Based on their morphology and results of RFLP analysis, 70 of them were chosen for physiological and biochemical tests as well as 16S rRNA identification. The results indicated that these strains were grouped into four genera *Brevibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus*. Thirteen species of genus *Bacillus* were found out, including *B.circulans*, *B.lentus*, *B.megaterium*, *B.sphaericus*, *B.horis*, *B.mycoides*, *B.pantothenicus*, *B.pumilis*, *B.firmus*, *B.fusiformis*, *B.licheniformis*, *B.coagulans*, *B.subtilis*.

3. Nine strains, with high efficiency of producing amylase, protease and lipase, had been screened out from those spore-producing bacteria by selective media. Their conditions of enzyme-producing were optimized and the activities of crude enzymes were determined. The results showed that most of them had high enzyme activities in the certain condition of temperature, pH value and salinity. Among them, one strain, designated as *Bacillus licheniformis* S-40, was chosen as potential probiotic for shrimp culture experiment according to its high and stable activities of digestive enzymes.
4. An experiment was conducted with the strain *Bacillus licheniformis* S-40 as a supplement, to investigate its effects on the intestinal microflora, and the immune response of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Shrimp were fed in four tanks for 40 days with different water conditions, control (non-supplemented), and water supplemented with *B. licheniformis* S-40 at 10^3 cfu·mL⁻¹, 10^4 cfu·mL⁻¹, and 10^5 cfu·mL⁻¹ respectively. The results indicated that compared to the control group, the total bacterial counts in the shrimp intestine remained constant, while *Vibrio* sp. numbers decreased significantly, and the total haemocyte count (THCs) and PO activity in the shrimps increased significantly, SOD activity increased significantly only when water was supplemented with *B. licheniformis* S-40 at 10^5 cfu·mL⁻¹. However, the protein contents were not remarkably different between the experimental and control groups.
5. Finally, the spores of *B. licheniformis* S-40 were embedded in microporous starch to make microcapsule. By analyzing multiple factors, the optimal embedding

conditions were estimated as follows: pH 7.5, temperature 30°C, absorption time 1.5 h.

Keywords: shrimp, aquaculture, microbial diversity, probiotics

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

水产业对人民生活和社会发展具有十分重要的作用,水产捕捞和水产养殖是水产业的两大支柱,但是由于对海洋渔业资源的过度捕捞,联合国粮农组织估计,到 2020 年,世界上半数的海产品将由养殖业提供,水产养殖业已进入大规模的工场化养殖阶段。作为水产业的支柱产业,对虾养殖始终是人们关注的焦点。

随着现代集约化和规模化水产养殖业的发展,应激原增多,导致水产动物免疫抗病力下降,其对疾病的易感性大大增强。人们通常采用抗生素、化学合成药物等防治水产动物疾病,但长期、大量使用抗生素的负面效应日益明显地暴露出来了:不仅破坏水产动物肠道正常菌群组成,造成肠道内微生态失调,导致对病原微生物的易感性以及细菌耐药性,而且会在体内残留,引起过敏等不良反应,并造成整个生态环境的污染,这严重阻碍了无公害水产养殖业的发展。接种疫苗是目前水产养殖上预防传染性疾病的一个最为有效的办法,但疫苗也有缺陷,比如针对性强、作用范围小。对于特异性免疫系统发育不完善的仔鱼和特异性免疫系统不够发达或缺乏的低等无脊椎动物(如虾、贝类等)作用有限。

近年来,人们开始尝试在养殖水体中施用微生态制剂(Probiotics)来改善养殖生态环境,提高养殖动物的免疫力,抑制病原微生物,从而减少疾病的发生。现行的大多数水产微生态制剂菌株均来自畜禽微生态制剂,而微生态制剂菌株有宿主特异性,因而适用于畜禽的微生态制剂未必对水产动物有效。故此,现在的研究趋向于从水产动物本身或其所处环境进行微生态制剂候选菌株的筛选。所以进行养殖生态环境微生物多样性的研究,不仅可为养殖病害的防治提供基础性信息,而且还为我们寻找特殊功能的微生物菌种提供丰富的生物资源。

基于此,本论文利用分子生物学技术对养殖环境和对虾肠道的微生物群落结构进行了深入细致的研究;从养殖环境和对虾肠道中获得了 100 多株产芽孢细菌,并对其进行了鉴定,通过消化酶活性实验从中筛选获得潜在益生菌株。实验证明,一株地衣芽孢杆菌 S-40 能够显著改善对虾肠道微生态环境且能提高其免疫机能。这方面的研究,在国内外都鲜有报道,其结果为水产微生态制剂的筛选提供一定的理论和实践基础,具有重要的经济、生态和社会效益。

1.1 对虾养殖业现状

对虾科(Penaeidae)包括 30 余属, 350 余种, 是重要的渔业捕捞对象及养殖种类。尤以对虾属、新对虾属、鹰爪虾属、拟对虾属等的种类为主要经济种类。其中对虾属由于经济意义重大, 是对虾科中研究最多的属。我国养殖产量较多、经济价值较高的种类有: 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、长毛明对虾(*Fenneropenaeus penicillatus*)、墨吉明对虾(*Fenneropenaeus merguensis*)、日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)、短沟对虾(*Penaeus semisulcatus*)、细角滨对虾(*Litopenaeus stylirostris*)等。

对虾养殖业从最初的农业已经向工业化过渡, 成为资金流动最快的行业之一。从南美到欧洲以及亚洲, 对虾养殖已经在接近五十多个国家启动并发展壮大, 从而提供了大量的就业岗位^[1]。对虾养殖在世界水产业中占居十分重要的地位, 近几十年来, 全球对虾养殖业发展迅速, 尤其是我国, 对虾产量在全球占有相当的比重, 是沿海地区发展经济, 出口创汇的支柱性产业之一。

然而, 随着对虾养殖规模的不断扩大, 各种传染性疾病也不可避免的发生了, 1993 年以后, 由于对虾病毒性疾病的暴发, 我国对虾养殖业出现了大幅度的滑坡, 对虾养殖业步入了低谷, 养殖对虾总产量急剧下降。1993 年的产量只有 8.7 万 t, 1994 年又下降到 5.5 万 t, 只相当于鼎盛时期的 1/4, 年直接经济损失达数十亿元人民币。许多对虾养殖场只得转产养殖其他品种或者停产, 对虾出口量急剧下降。虽然 1996 年以后, 全国的对虾养殖业开始出现复苏迹象, 养殖产量已开始回升^[2], 但是病害特别是病毒流行病是仍然是目前困扰我国对虾养殖业生存和发展最突出的问题。有关单位已经进行了虾病的病原、病理、传播途径及快速诊断方法的研究, 并且取得了一定的进展, 但还没有研究出有效的预防和治疗方案。因此, 普遍认为优化和保持良好的养殖环境、进行健康养殖是对虾养殖业走出流行病困扰的一条较好出路^[2,3]。

尽管目前在改善和优化养殖环境方面, 已经有了许多成功的经验, 如: 清淤、增氧、使用水质消毒剂和水质改良剂、合理投饵、合理密度、封闭或半封闭养殖及混养等, 亦有许多学者做了很好的总结^[4,5]。但是, 这些研究大多是经验性的, 带有一定的局限性。李庆彪等研究了对虾养殖生态系统的特点, 认为对虾养殖生

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库